DIE ISOENZYM-MUSTER EINIGER FERMENTE AUS RINDER-RETINA UND RINDER-SERUM

Edgar Schmutte

1966

Aus der Klinik für Augenkrankheiten der Universität Frankfurt am Main
(com. Direktor : Professor Dr. W. A. Lieb)

DIE ISOENZYM-MUSTER EINIGER FERMENTE AUS RINDER-RETINA UND RINDER-SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Edgar Schmutte
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 1966

Dekan : Professor Dr. med. W. Rotter

Referent : Professor Dr. med. W.A. Lieb

Korreferent : Professor Dr. med. E. Heinz

Mündliche Prüfung : 12. Oktober 1966

MEINEM VATER

IN DANKBARKEIT

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

https://archive.org/details/IA41546410_0016

Inhalt

		Seite
I.	Einleitung	7
II.	Hauptteil	9
1.	Abschnitt (LDH) Allgemeines - Eigene Ergebnisse - Allgemeines zum histochemischen Nachweis der Dehydrogenasen - Aufbereitung der Retina - Gewinnung von Vergleichsserum - Agar-Elektrophorese (Methodik) - Prinzip der Tetrazoliumsalz-Färbung	9
2.	Abschnitt (MDH) Allgemeines - Eigene Ergebnisse - Experimentelle Methodik	20
3.	Abschnitt (ICDH) Allgemeines - Eigene Ergebnisse - Experimentelle Methodik	23
4.	Abschnitt (G-6-PDH) Allgemeines - Eigene Ergebnisse - Experimentelle Methodik	26
5.	Abschnitt (AP) Allgemeines - Eigene Ergebnisse - Experimentelle Methodik	30
III.	Diskussion Das Homogenisat - Elektroosmotische Vorgänge - Die Aussparung in der G-6-PDH-Bande - Die Deformation des Retina-Startschlitzes und die Anreicherung der Enzymaktivität an dieser Stelle - Die intracelluläre Lokalisation von Enzymen -	34

Seite

Die Hypothese (W a c h s m u t h) über die Zusammenhänge von Isoenzym-Muster und polyploider Zelldifferenzierung am Beispiel der LDH.

IV. Z u s a m m e n f a s s u n g 40

A n h a n g :

Literaturverzeichnis 41

I. Einleitung

Seit der Erkenntnis, daß Veränderungen der Aktivität von bestimmten Enzymen im Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten gebracht werden können, rücken die physikochemischen Eigenschaften der Enzyme und ihrer Isoenzyme immer mehr in den Mittelpunkt des medizinischen Interesses. Wir sind z.B. in der Lage, von Konzentrationsveränderungen der GOT und GPT im menschlichen Serum auf bestimmte Herz- bzw. Leberkrankheiten zu schließen. Ebenso gibt uns die Konzentrationsänderung der sauren und alkalischen Phosphatase im Serum wertvolle Hinweise bei der Diagnose des Prostata-Carcinoms und seiner Metastasierung. Voraussetzung für eine solche Aussage ist natürlich, daß das Verhalten der Enzyme unter physiologischen Verhältnissen genau studiert wurde.

Bei der elektrophoretischen Untersuchung konnten bei einer Reihe von Enzymen einzelne Fraktionen aufgetrennt werden - entsprechend ihrem unterschiedlichen kinetischen Verhalten. Aufgrund noch anderer Merkmale dieser Isoenzyme kommen wir zu folgender Definition : Unter "Isoenzymen" oder "Isozymen" verstehen wir die einzelnen Fraktionen eines Fermentes, die bei gleicher Substratspezifität sich in ihrem physikochemischen, immunologischen und kinetischen Verhalten unterscheiden (entsprechende Verfahren : Elektrophorese, Säulenchromatographie, Hemmbarkeit, u.a.).

Unter "Isoenzym-Muster" verstehen wir ein Enzym mit einer bestimmten Zahl seiner Isoenzyme. Der Anteil der Isoenzyme schwankt aber nun von Organ zu Organ, so daß wir zu der grundsätzlichen Feststellung kommen, daß jedes Organ sein spezifisches Isoenzym-Muster hat.

In diesem Zusammenhang konnten Pfleiderer und Wachsmuth am Beispiel der LDH zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen Isoenzym-Muster eines Organs und dessem Stoffwechsel besteht, und daß das organtypische Isoenzym-Muster sich erst kurz nach der Geburt ausdifferenziert (1).

Die Erforschung der Enzyme (Fermente) schließt also notwendigerweise die Erforschung der Isoenzyme ein. Da die Retina als eines der stoffwech-

selaktivsten Organe bekannt ist dürfte die Aufschlüsselung ihrer Isoenuym-Muster von besonderem Interesse sein.

Am Beispiel der Rinder-Retina und des Rinder-Serums wird die elektrophoretische Auftrennung folgender Enzyme in ihre Isoenzyme abgehandelt :

1. Lactat-Dehydrogenase (LDH)
2. Malat-Dehydrogenase (MDH)
3. Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH)
4. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH)
5. alkalische Phosphatase (AP)

Die Enzyme wurden mittels der Agar-Gel-Elektrophorese fraktioniert. Die im Gel gefundenen Zonen wurden durch direkte Anfärbung sichtbar gemacht.

Die Rinder-Retina wurde als Untersuchungsmaterial aus folgenden Gesichtspunkten heraus gewählt :

1. Notwendig ist Material, das - dem l e b e n d e n Organismus entnommen - so schnell wie möglich verarbeitet wird. Eine Biopsie am lebenden menschlichen Auge scheitert am großen Risiko der Netzhautablösung in all ihren Formen und Folgen oder der Erblindung.

2. Risikolos in dieser Hinsicht wäre nur die Biopsie am amaurotischen Auge. Dafür stünden aber einerseits zu wenig Augen zur Verfügung, andererseits wäre das Verfahren der Biopsie dadurch erschwert, da es für die fermentative Auswertung eine Mikrotechnik, etwa im Sinne der Präparationstechnik von Honegger (5), voraussetzen würde.

3. Schließlich könnte die Retina noch kurz nach dem Ableben eines Patienten gewonnen werden. Dieses Verfahren dürfte aber an dem fehlenden Einverständnis der Angehörigen scheitern.

Im Gegensatz dazu sind bei dem Untersuchungsmaterial von Rindern die entscheidenden Voraussetzungen erfüllt : Das Material kann körperwarm gewonnen werden, und es steht in ausreichender Menge zur Verfügung.

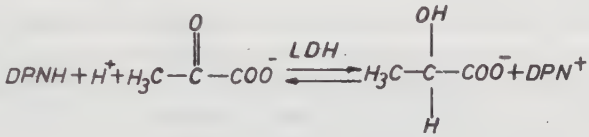
Aus Gründen der Übersicht wird im einzelnen wie folgt vorgegangen : Die Enzyme werden abschnittsweise gesondert abgehandelt, wobei der erste Teil jeweils den theoretischen Erörterungen und den Ergebnissen gewidmet, während der zweite der Beschreibung der Methoden und der experimentellen Technik vorbehalten ist.

II. Hauptteil

(Ergebnisse - Experimentelles - Methodik)

1. Abschnitt (Lactat - Dehydrogenase (LDH)

Die LDH katalysiert in reversibler Reaktion die Hydrierung von Pyruvat zu Lactat :



Pyruvat **Lactat**

Die LDH gehört zu den Enzymen, die schon sehr eingehend in Bezug auf die zugehörigen Isoenzyme untersucht wurden. So hatte Neilands 1952 herausgefunden, daß sich aus Rinder-Herz dargestellte LDH elektrophoretisch zwei Fraktionen auftrennen ließen. Inzwischen konnten an Organen von Säugetieren bis zu fünf Fraktionen mit LDH-Aktivität festgestellt werden (2). Nachdem 1957 Sayre und Hill sowie Vesell und Bearn im menschlichen Serum drei Fraktionen trennen konnten, gelang es später, auch im Serum fünf Fraktionen der LDH aufzutrennen (3). Inzwischen sind wenigstens acht Organe des Menschen auf LDH-Aktivität untersucht worden (Herzmuskel, Niere, Großhirn, Kleinhirn, Erythrozyten, Leber, Skelettmuskel und Epidermis), und es hat sich dabei gezeigt, daß in allen untersuchten Organen nicht nur die Aktivität der LDH insgesamt, sondern auch Zahl und prozentualer Anteil zur Gesamtenzymmenge der Isoenzyme stark schwankt (4).

Am Rattenherz und der Rattenleber konnte die Zusammensetzung der LDH-Fraktionen hinsichtlich der Aminosäuren sehr genau untersucht werden (4).

Neuerdings soll in der Chorioidea des Rinderauges noch ein sechstes Isoenzym der LDH gefunden worden sein, welches zur Anode wandert (5).

W.L. Fowlks et al. berichten von einem anderen Isoenzym der LDH, welches sie aus der Linse des Rindes, des Kaninchens und des Hundes isolieren konnten. Im Vergleich zu den bisher bekannten Isoenzymen weist es Unterschiede auf in Bezug auf :

1. Hemmbarkeit durch komplexe Metallverbindungen
2. pH-Maximum der spezifischen katalytischen Funktion
3. Löslichkeit in 50 %-igem Ammoniumsulfat
4. Ansprechbarkeit auf Reagentien mit SH-Gruppen
5. Form der Kristalle (6).

Die Verhältnisse der LDH und ihrer im menschlichen Serum nachgewiesenen fünf Fraktionen sind heute soweit aufgeklärt, daß das charakteristische Überwiegen dieser oder jener Komponente bei der Diagnose folgender Krankheiten behilflich sein kann : Herzinfarkt, Verschlußikterus, Morbus Biermer, Hepatitiden, Carcinome (7).

Die elektrophoretische Auftrennung der LDH in der Rinder-Retina und im Rinder-Serum ergab folgendes Bild :

Aus der Rinder-Retina (R) lassen sich bei der LDH drei Fraktionen oder Isoenzyme trennen, wobei Isoenzyme a und b zur Anode wandern, während Isoenzym c zur Kathode wandert (siehe Abb.1). Die Bezeichnung mit kleinen, lateinischen Buchstaben ist gewählt, weil die Identität der gefundenen Banden mit den üblicherweise I - V bezeichneten LDH-Isoenzymen des Serums nicht ausreichend geklärt werden konnte. Das Isoenzym mit der größten anodischen Wanderungsgeschwindigkeit wird mit a bezeichnet, das nächstfolgende mit b usw.

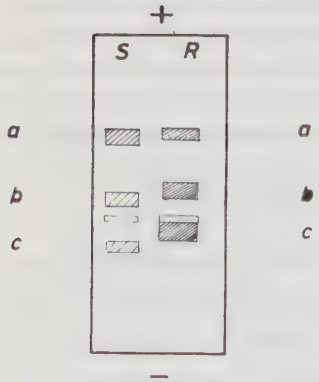


Abb. 1

Alle drei Isoenzyme sind klar voneinander getrennt. Bei den Versuchen war das Isoenzym c einmal am schwächsten, ein anderes Mal gleich stark angefärbt wie Isoenzym a und b. Für die Ursache dieser Schwankungen ergaben sich keine Anhaltspunkte. Im Serum (S) fanden wir ebenfalls

drei Isoenzyme : Isoenzym a und b wandern zur Anode, Isoenzym c zur Kathode. Die anodenwärts wandernden Isoenzyme (a und b) sind etwas langsamer gewandert als die entsprechenden der Retina, während Isoenzym c etwas schneller wanderte als das kathodisch wandernde Isoenzym c der Retina. Nach dem Intensitätsgrad der Anfärbung der gefundenen Banden im Serum zu urteilen,hat Isoenzym a die stärkste Aktivität, Isoenzym c die schwächste. Alle drei Banden sind aber insgesamt deutlich weniger intensiv angefärbt als die der Retina.

Wir fassen zusammen :
In der Rinder-Retina läßt sich die LDH in drei Isoenzyme auftrennen : Isoenzym a und b anodenwärts, Isoenzym c kathodenwörts wandernd.

Im Rinder-Serum kamen wir zu dem gleichen Ergebnis, nur unterscheiden sich diese Banden von denen der Retina in Bezug auf die Wanderungsgeschwindigkeit und den Intensitätsgrad der Anfärbung (siehe oben). Das Isoenzym c im Serum war nur in schwächster Anfärbung nachweisbar.
Alle Isoenzyme in Retina und Serum lassen sich gut voneinander trennen.

Methodik

1. Aufbereitung des Retina-Materials

Pro Ansatz werden 6 - 10 - 12 Rinderaugen benötigt. Sie werden körperwarm vom Schlachthof geholt und gleich an Ort und Stelle in einer mit Eis gefüllten Thermosflasche konserviert. Dort werden sie auch gleich aussortiert : Augen, die sichtbare Schäden aufweisen, werden nicht weiter verwendet. Innere Verletzungen stellen sich erst bei der Präparation heraus. In diesem Falle scheiden auch die Retinae dieser Augen als Untersuchungsmaterial aus.

a) Präparation der Retina

Zuerst wird die vordere Äquatorhälfte des Bulbus von Muskelresten gut gesäubert. Mit einer Breitlanzette wird nun der Bulbus perforiert, und zwar etwas vor dem Äquator, also noch in der vorderen Hälfte des Bulbus. Von der Perforationsstelle aus wird mit einer kleinen scharfen Schere ein Schnitt parallel zum Äquator gelegt : der Bulbus wird in eine größere hintere und eine kleinere vordere Hälfte geteilt. Das gallertartige corpus vitreum läßt sich gut herauslösen. Wer wenden uns nun der hinteren Hälfte des Bulbus zu, also jener, welche die papilla nervi optici aufweist. Mit einer feinen anatomischen Pinzette wird die Retina vom äußeren Rand in Richtung auf die Papille präpariert. Die isolierten Retinae werden in einem eisgekühlten Glaskolben aufbewahrt.

b) Homogenisierung

Die mit Ringerlösung versetzen Retinae werden im Bühler-Homogenisator 2 1/2 bis 3 Min. bei 48 000 U/Min. homogenisiert. Auf 6 Retinae kommen 5 ml Ringerlösung. (Ringerlösung : 8,0 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,249 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ad 100 ml). Bei diesem Arbeitsvorgang wird die Temperatur durch einen Eiswasser-Behälter weiter konstant niedrig gehalten, in dem der Glaskolben während des Homogenisierens hängt.

c) Das Zentrifugieren

Das Retina-Homogenisat wird 15 Min. bei 17 000 U/Min. bei 0° C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand des Retina-Homogenisates wird je nach den Erfordernissen unverdünnt, 1 : 10 oder 1 : 100 verdünnt bei den Versuchen verwendet. In einem mit Para-Film dicht verschlossenen Reagensglas wird der Überstand des Homogenisates im Kühlschrank aufbewahrt.

2. Gewinnung des Serums

Das Blut einzelner Rinder wird beim Ausbluten der Tiere aufgefangen. Die mit Blut gefüllten Reagensgläser kommen ebenfalls in die mit Eis gefüllte Thermosflasche. Im Labor wird das Blut 15 Min. bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Mit Para-Film gut verschlossen wird das Serum (der Überstand) ebenfalls im Kühlschrank aufbewahrt.

3. Vorbereitung für die Agar-Elektrophorese

a) Reinigung und Beschriftung der Objektträger

Zur Reinigung werden die Objektträger in Chrom-Schwefelsäure gelegt, mindestens eine halbe Stunde, meistens jedoch mehr als 24 Stunden. Dann kommen sie aus dem Säurebad heraus, werden gründlich gewässert, sodann mit Alkohol behandelt und abschließend mit einem Föhn getrocknet.

Auf je 4 nebeneinander gelegten Objektträger werden mit Lineal und Glasdiamant die Startlinien in gleicher Höhe am linken und rechten Rand markiert. Die Markierungen unterteilen die Objektträger in zwei ungleiche Hälften, wobei der größere Weg zur späteren Anode weist. (Die meisten Fraktionen wanden nämlich erfahrungsgemäß zur Anode). Das erleichtert auch die spätere Orientierung in Bezug auf die Richtung des elektrischen Feldes. Am Ende der längeren Hälfte wird das jeweilige Datum eingraviert, am entgegengesetzten Ende wird laufend durchnummeriert.

b) Herstellung der Agar-Schalen

Ansatz für die Agarlösung (0,9 %)

1,08 g Reinagar

120 ml Veronalpuffer (Veronal-Stammpuffer mit aq.dest. 1 : 4 verdünnt)

Veronal-Stammpuffer

15,83 g Na diaethlybarbituricum)
4,20 g Acid. diaethlybarbituricum) ad 1000 ml aq.dest. gelöst.

In im Wasserbad erhitzten 120 ml 1 : 4 verdünntem Veronal-Stammpuffer werden 1,08 g Reinagar gelöst. Der Agar muß 10 Min. im erhitzten Puffer quellen. Ist er vollständig gelöst, werden die ungelösten Anteile bei 3 000 U/Min. ca. 2 - 3 Min. abzentrifugiert. Nun gießt man zunächst 50 ml Agarlösung in eine Petrischalle von 14 cm Innendurchmesser und läßt erkalten. Auf diese Weise wird eine waagerechte Fläche geschaffen, auf welche die Objektträger aufgebracht werden. Dann werden weitere 35 ml Agarlösung hinzugefügt. Nachdem auch diese Agarschicht in 10 - 15 Min. erstarrt ist, wird die Petrischale verschlossen in einen Kühlschrank gestellt. Erst wenn sie gut durchgekühlt ist, soll sie für die Versuche weiter verwendet werden.

c) Beschickung der ausgegossenen Objektträger für die Elektrophorese mit dem Untersuchungsmaterial

Es hat sich bei der Arbeit als vorteilhaft erwiesen, die Objektträger schon vor dem Herausschneiden aus der Petrischale mit Startschlitzen zu versehen und diese mit dem Untersuchungsmaterial zu beschicken.

Im einzelnen wird folgendermaßen vorgegangen : Mit einer selbstgefertigten "Guillotine" (zwei Rasierklingen von je 7 mm Schnittlänge, die zwischen zwei Objektträgern eingeklemmt sind), werden in die Agar-Schicht eines jeden Objektträgers in Höhe der Markierungsstriche zwei Startschlitze von je 7 mm Länge eingestanzt. Durch eingesteckte Filterpapier-Blättchen mit einer Kantenlänge von 7 x 7 mm wird etwas Flüssigkeit aus den eingestanzten Startschlitzen herausgesogen, so daß in die freigewordenen Räume die aufzutrennenden Gemische injiziert werden können. Die Blättchen werden mit einer Pinzette vorsichtig in die Startschlitze eingesetzt. Sie sollen im eingesteckten Teil nicht umknicken. Weil durch "Ausschwitzen" des Puffers aus dem Agar das Startschlitzreservoir vorzeitig gefüllt werden kann, wird jeweils nur der Teil der Startschlitze in der beschriebenen Weise vorbereitet, der kurz darauf beschickt werden soll. Je Startschlitz werden 5 Mikroliter der Untersuchungsflüssigkeit injiziert. Wir verwenden dazu eine Mikro-Spritze (Hersteller : Fa. Hamilton) mit einem Fassungsvermögen von 10 Mikrolitern. Bei der Injektion wird auf die gleichmäßige Injektion aller Startschlitze geachtet. Ein Überlaufen ebenso wie eine zu geringe Füllung der Startschlitze sind unbedingt zu vermeiden. Im letzteren Falle können sich bei der Elektrophorese Luftblasen bilden, wodurch das gleichmäßige elektrische Feld gestört würde.

Die Objektträger werden nun mit einem feinen Skalpell ausgeschnitten und bis zum Einlegen in die Elektrophoreseapparatur mit der Agarschicht nach oben in eine feuchte Kammer eingebracht.

4. Durchführung der Agar-Elektrophorese (Verfahren nach Wieme (8))

Wieme hat durch folgenden Kunstgriff ein thermokonstantes Arbeiten bei niedriger Temperatur erreicht (Abb. 2).

Die Elektrophorese findet in einem Petrolaether-Bad statt, das mittels Durchperlen von Luft abgekühlt wird. Der dabei verdampfte Petrolaether wird an der darüber befindlichen Eiswanne wieder kondensiert. Für die Temperaturregelung werden die Änderungen in der Leitfähigkeit des pufferhaltigen Agars unter dem Einfluß der Temperatur ausgenutzt. Bei konstant vorgegebener Spannung steigt der Stromdurchfluß mit zunehmender Temperatur an; dieser Anstieg der Stromstärke bewirkt über ein Relais das Ingangsetzen der Luftpumpe. Umgekehrt schaltet die Pumpe ab, sobald die vorgegebene kritische Stromstärke unterschritten wird. Die Einzelheiten sind aus Abb. 2 zu ersehen. Zusätzlich wird auf die Arbeitsvorschrift der Fa. Vitatron verwiesen.

Wird die mit Agar ausgegossene Elektrophoresekammer im Kühlschrank verwahrt, so werden dadurch Zeitverluste vermieden, die sonst durch das notwendige Vorkühlen entstanden wären. Aus dem gleichen Grund wird der Petrolaether in zwei Portionen bei -10° C und $+4^{o}$ C aufbewahrt, so daß sich durch gezieltes Mischen rasch die gewünschte Temperatur in der Elektrophoresekammer einstellen läßt.

Die Objektträger werden mit der Agarschicht nach unten eingelegt, so daß die Enden der Schicht mit den beiden Agarblöcken leitenden Kontakt haben.

Nach beendigter Elektrophorese werden die Objektträger bis zur Inkubation (siehe unten) mit der Agarschicht nach oben in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

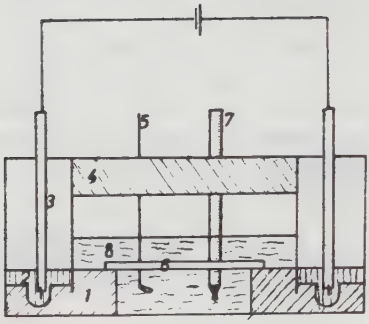


Abb. 2 Elektrophorese - App. nach WIEME

1 = Agar-Blöcke; 2 = Puffer (Veronal-Stammpuffer 1 : 4 verdünnt); 3 = Elektroden;
4 = Eiswürfelbehälter; 5 = Luftzufuhr;
6 = Objektträger mit der Agar-Schicht nach unten;
7 = Thermometer; 8 = Petrolaether.

5. a) Inkubation (nach van der Helm (9))

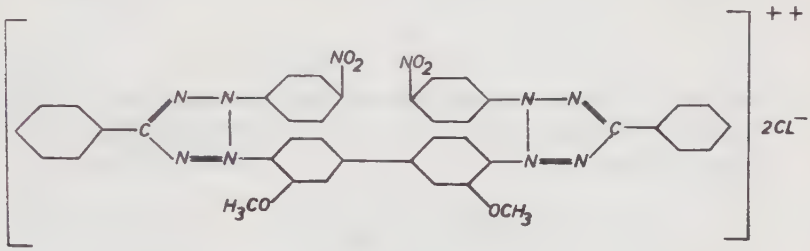
Die Inkubationslösung wird während der laufenden Elektrophorese angesetzt. Die Objektträger werden nun in kleine Petrischalen mit der Agarschicht nach unten auf an den Enden unterlegte Streichhölzer gelegt und mit der Inkubationslösung unterschichtet (ca. 3,5 ml/Objektträger). Es wird darauf geachtet, daß sich dabei keine Luftblasen bilden. Waren sie nicht zu vermeiden, sind sie durch vorsichtiges Manipulieren wieder zu entfernen. Sodann wird bei 37° C inkubiert. Die Inkubationsdauer für die einzelnen Enzyme ist sehr verschieden.

b) Über die Färbungsmethode mit Tetrazoliumsalzen

Da bei allen Dehydrogenasen, die hier abgehandelt werden (LDH, MDH, ICDH und G-6-PDH), diese histochemische Methode Anwendung findet,

sei an dieser Stelle kurz auf das Prinzip dieser Methode eingegangen (10, 11). Die biochemischen Einzelheiten mögen an anderer Stelle nachgelesen werden (12, 13, 14). Das Prinzip beruht darauf, daß von dem Substrat, welches dehydriert wird, der Wasserstoff über eine Reihe von Zwischenstufen auf ein Tetrazoliumsalz übertragen wird, welches als unlösliches Formazan rot bis blau gefärbt ausfällt.

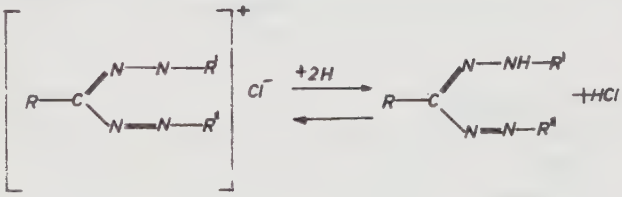
Als Tetrazolimsalz wird von uns das NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) verwendet.



NBT

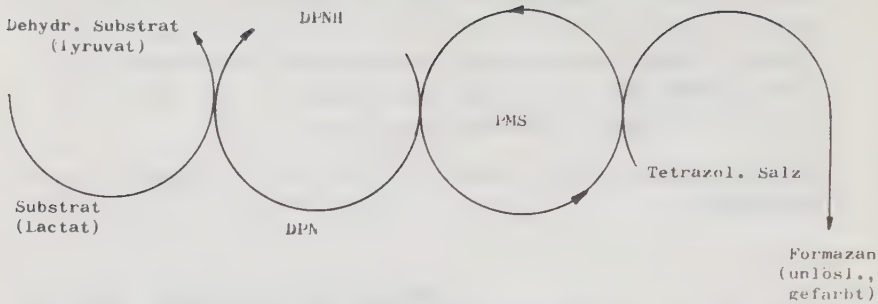
(Dimethoxydiphenylentetraphenylditetrazoliumchlorid)

Der letzte Schritt der gesamten Reaktion (siehe unten), d.h. die Hydrierung des NBT und Ausfällung als Formazan läßt sich schematisch wie folgt formulieren :



Tetrazoliumsalz Formazan

Aus der Formel des NBT ist zu erkennen, daß das NBT-Molekül aus zwei symmetrischen Hälften besteht, wobei jede für sich in Formazan umgewandelt wird. So ist auch der Übergang von der Rot- und Blaufärbung (Mono- bzw. Di-Formazan) zu erklären : das Mono-Formazan liegt in roter, das Di-Formazan in schwarzblauer Färbung vor. Die Gesamtreaktion kann folgendermaßen formuliert werden :



Der Schritt DPNH ⟶ PMS (Phenazinmethosulfat) ⟶ NBT ist unerläßlich. Ohne PMS kann der Wasserstoff vom DPNH nicht auf NBT übertragen werden.

c) Wässern, Fixieren, Trocknen

So bald sich die angefärbten Banden gut darstellen, wird die Inkubation beendet. Anschließend werden die Objektträger mit Aq.dest. gespült. Über Nacht werden sie zwischen Filtrierpapier bei 37° C getrocknet. Nach dem Spülen kann auch fixiert werden.

Ansatz für Fixierlösung
5 ml Eisessig (98 - 100 %-ige CH_3 - COOH)
70 ml Aethanol (C_2H_5OH)
25 ml Aq. dest.
Das Fixieren von 20 - 30 Min. ist ausreichend.

Später jedoch wurde meistens auf das Fixieren verzichtet.

Elektrophoresebedingungen
Laufzeit der Elektrophorese : 60 Min. bei 27V/cm
Temperatur : 6° C
Inkubationszeit : ca. 20 - 30 Min.
Fixierung : 30 Min.

Inkubationsansatz LDH/MDH

2 ml NaH_2PO_4 (0,2 m)	)		)
8 ml Na_2HPO_4 (0,2 m)	)	zusammen gelöst	)
20 mg KCM	)	= 10 ml	) Stammlösung
8 mg NBT	)		) = 15 ml
2 mg PMS	)	mit 5 ml Aq. dest.	)
4 mg DPN	)	quantitativ überführen	)

pH der Lösung = 7,5

Lactatlösung

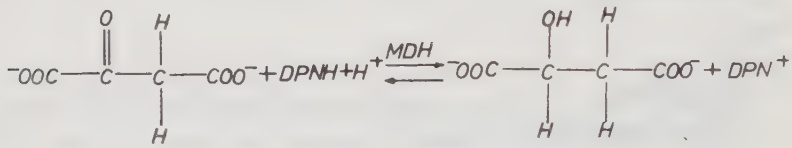
0,56 ml Na-Lactat 50 %-ig auf
10 ml mit Aq. dest. auffüllen

7,5 ml Stammlösung	)	Inkubationslösung für LDH (asureichend
2,5 ml Lactatlösung	)	für 4 Objektträger)

Weitere technische und theoretische Einzelheiten über die Agar-Gel-Elektrophorese mögen an anderer Stelle (15, 16, 17) nachgelesen werden.

2. Abschnitt Malat - Dehydrogenase (MDH)

Die MDH ist ein Enzym des Citratcyclus. Sie katalysiert in reversibler Reaktion die Hydrierung von Oxalacetat zu Malat :



Oxalacetat Malat

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt bei neutralem pH weit auf der rechten Seite der Gleichung.

Die MDH wurde 1910 von Thunberg, Batelli und Stern entdeckt. Das Enzym kommt in tierischen und pflanzlichen Geweben sowie Mikroorganismen vor. Bücher et al. fanden die MDH sowohl in den Mitochondrien als auch im Cytoplasma der Zelle. Sie konnten zeigen, daß beide Enzymformen sich hinsichtlich des pH-Optimums und der Substrataffinität unterscheiden (18, 19). Die Verteilung der beiden Enzymformen ist in den einzelnen Organen verschieden. Im Cytoplasma der Leber ist die Aktivität der MDH am größten, dann folgen Herz, Skelettmuskel und Gehirn. Wie bei den LDH-Isoenzymen handelt es sich um verschiedene Enzymproteine gleicher Wirkungs- und Substratspezifität, aber verschiedenen Ursprungs und verschiedener Aktivität (20).

Die Isoenzyme der MDH wurden u.a. im menschlichen Serum von Vesell et al. untersucht : Mittels der Stärkegel-Elektrophorese ließ sich die MDH in drei Fraktionen auftrennen, die bei der Elektrophorese in Bezug auf ihre Lokalisation ein ähnliches Bild geben wie die LDH im Serum (21, 22).

- - - - - - - - - - -

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der MDH-Isoenzyme in der Rinder-Retina und im Rinder-Serum sind wir zu folgenden Ergebnissen gekommen (s. Abb. 3): In der Rinder- R e t i n a (R) läßt sich die MDH in 3 Fraktionen (Isoenzyme) auftrennen: Isoenzym a und b anodenwärts wandend, Isoenzym c kathodenwärts wandernd. Im Vergleich zu den Fraktionen der LDH, die sich alle gut trennen ließen, ist die Separation bei der MDH nur verwaschen gelungen. Es fällt auf, daß sich die Isoenzyme a und b vollständig trennen, während das Isoenzym c als Bande besser isoliert ist. Es fällt weiter auf, daß das Isoenzym c nur in sehr schwacher Anfärbung zur Darstellung gelangt, während die Isoenzyme a und b stark angefärbt sind, was offenbar für eine stärkere enzymatische Aktivität spricht.

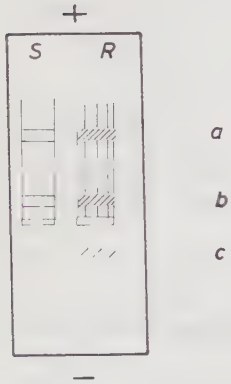


Abb. 3

Diese Unterschiede waren reproduzierbar. Auch wenn die LDH und MDH in der gleichen Elektrophorese wanderten, d.h. unter genau gleichen Bedingungen in Bezug auf Spannung, Laufzeit und Temperatur, war dasselbe Ergebnis festzustellen.

Im S e r u m (S) ist das Ergebnis so gut wie negativ. Während die photometrische Durchmessung kein positives Resultat erbrachte, sind beim Betrachten des Objektträgers mit bloßem Auge äußerst schwach angefärbte, kaum zu erkennende Banden zu sehen. Es sind dies zwei Fraktionen, die bezüglich ihrer Wanderungsgeschwindigkeit den Isoenzymen a und b der Retina gleichen. Ein weiteres Isoenzym war optisch nicht festzustellen.

Wir fassen zusammen:
Die MDH der Retina läßt sich in drei Fraktionen auftrennen: Isoenzym a und b anodenwärts, Isoenzym c kathodenwärts wandernd. Isoenzym a und b stellen sich nur verwaschen dar.
Im Serum lassen sich in äußerst schwacher Anfärbung zwei Fraktionen

erkennen, die bezüglich ihrer Lokalisation den Isoenzymen a und b der Retina entsprechen.

Experimentelles

Elektrophoresebedingungen

Temperatur während der Elektrophorese : 6° C
Puffer : Veronal-Stammpuffer 1 : 4 verdünnt
Inkubationszeit : bis zu 60 Min.
Laufzeit der Elektrophorese : ca. 60 Min. bei 27 V/cm

Die Stammlösung für den Inkubationsansatz ist dieselbe wie für die LDH.

Malatlösung

268 mg Äpfelsäure) mit Aq. dest. auf 25 ml im Messkolben
4,0 ml n/1 NaOH) auffüllen
7,5 ml Stammlösung + 2,5 ml Malatlösung = Inkubationslösung für MDH

Der Überstand des Retina-Zentrifugates und das Serum werden unverdünnt verwendet.

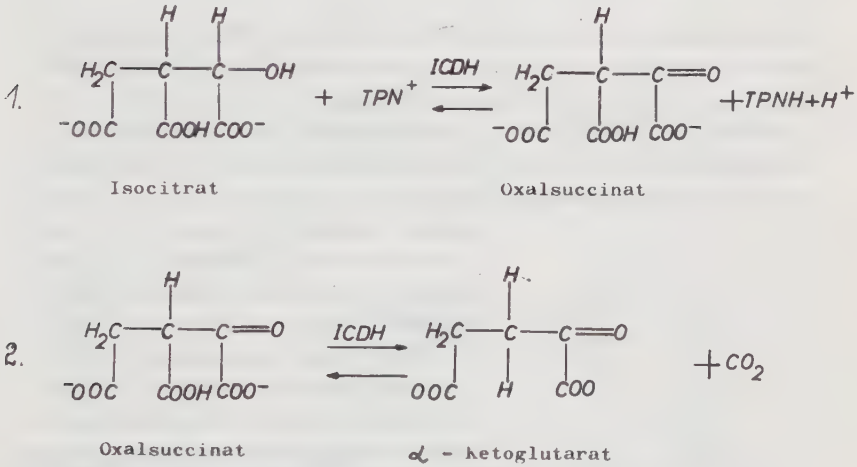
Einzelheiten der Technik und Methodik sind im Abschnitt der LDH nachzulesen.

3. Abschnitt (Isocitronensäure-Dehydrogenase (ICDH)

Die ICDH ist ein Enzym des Citratcyclus. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß sie zwei reversible Reaktionen katalysiert :

1. Die ICDH dehydriert die sekundäre Hydroxylgruppe des Isocitrates und überträgt den Wasserstoff auf TPN^+. So entsteht das Oxalsuccinat.

2. Gleichzeitig katalysiert sie die Decarboxylierung des Oxalsuccinates zu α-Ketoglutarat (23).



Bei beiden Reaktionen liegt das Gleichgewicht weit auf der rechten Seite.

T s a o (24) hat die Isoenzyme der ICDH am homogenisierten Rattengewebe und an zwei Zellarten des menschlichen Organismus untersucht und beschrieben. Seine Ergebnisse werden in folgenden Schemata wiedergegeben (nach Tsao) :

1 = Herz; 2 = Leber; 3 = Niere; 4 = Hirn; 5 = Erythrocyt; 6 = Amnionzellen; 7 = Zellen eines Ovar-Carcinom

Wie daraus zu entnehmen ist, sind entweder eine oder zwei Banden zur Darstellung gelangt, jedoch nie mehr als zwei. Eine Fraktion verbleibt am Startschlitz (Rattenherz), die andere wandert zur Anode. Sind zwei Banden nachzuweisen, so ist eine immer in unmittelbarer Nähe des Startschlitzes lokalisiert.

- - - - - - - - - - - - - - -

Wie die Abb. 4 zeigt, sind wir an der Rinder-Retina (R) zu ähnlichen Ergebnissen gekommen.

Die ICDH läßt sich in zwei Fraktionen auftrennen. Beide wandern zur Anode. Isoenzym b ist in unmittelbarer Nähe des Startschlitzes lokalisiert. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Enzymen (LDH, MDH, G-6-PDH, AP) fällt hier die eigenartige Form der angefärbten Fraktionen der ICDH auf. Bei den anderen Enzymen haben wir es in der Regel mit gleichmäßig breiten Banden zu tun, deren Breite der des Startschlitzes entspricht. Bei der ICDH dagegen erscheint das Isoenzym a als eine wesentlich schmälere Bande von langgestreckter Form. Wenn man die Ferment-inkubation nach verschiedenen Elektrophorese-Laufzeiten durchführt, ergibt sich folgendes Bild : Bei kurzer Elektrophorese-Dauer stellt sich das Enzym am Startschlitz als Keil dar, dessen Spitze zur Anode zeigt. Bei Fortdauer der Elektrophorese löst sich die Keilspitze als selbständige Fraktion ab : Isoenzym a. Die Basis des Keiles bleibt am Startschlitz zurück. Isoenzym b, so daß sich rein optisch der Vergleich mit einem Tropfen, der sich vom Wasserhahn ablöst, aufdrängt.

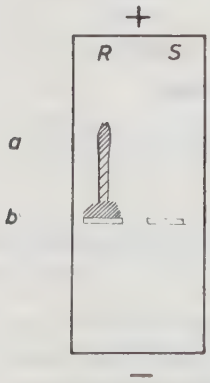


Abb. 4

Diese eigenartige Form der gefundenen Fraktionen ließ sich in der beschriebenen Weise immer wieder reproduzieren, jedoch konnte die Ursache dafür nicht geklärt werden.
Im Rinder-S e r u m (S) ließ sich mit der hier angewandten Methode keine ICDH-Aktivität feststellen.

Wir fassen zusammen :
Im Rinder-Retina-Homogenisat konnte ICDH-Aktivität gefunden werden. Sie läßt sich elektrophoretisch in zwei Fraktionen auftrennen, wobei die eine zur Anode wandert, die andere in der Nähe des Startschlitzes verbleibt.
Im Rinder-Serum ließ sich keine ICDH-Aktivität nachweisen.

Experimentelles

Elektrophoresebedingungen

Laufzeit der Elektrophorese : 45 - 80 Min. bei 27 V/cm
Temperatur während der Elektrophorese : 6° C
Puffer : Veronal-Stammpuffer 1 : 4 verdünnt
Inkubationszeit : 1 Stunde

Bei der Inkubation übernimmt TPN anstelle von DPN den Wasserstoff vom Substrat.

Inkubationsansatz ICDH

10 mg KCN	
1 mg PMS	werden in 20 ml Triaethanolamin-
4 mg NBT	Isocitronensäure (TRA/ICS) — Puffer
3 mg TPN	gelöst.

Herstellung des TRA/ICS-Puffers

a) 166 mg DL-ICS-Lacton) 10 Min. im Wasserbad lösen,
34 ml n/10 NaOH) abkühlen lassen

b) 1,94 g TRA-Hydrochlorid in 50 ml Aq. dest. lösen.

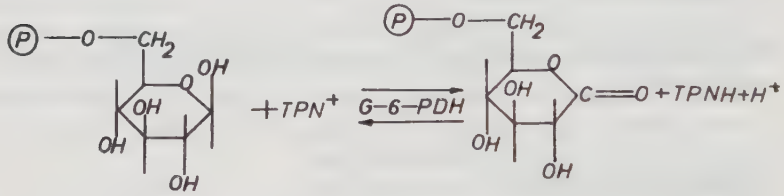
Anschließend a) und b) zusammengeben, pH = 7,5 einstellen, mit Aq.dest. ad 100 ml auffüllen.

Sind die Objektträger mit der Inkubationslösung unterschichtet, werden unter jeden Objektträger nochmals je 0,2 ml $MnCl_2$ 0,1 m nachpippetiert.

Überstand des Retina-Zentrifugates und Serum werden unverdünnt verwendet.

Einzelheiten des Arbeitsvorganges sind im Abschnitt der LDH nachzulesen.

Im intermediären Stoffwechsel kann die Glucose zwei verschiedene Reaktionswege beschreiten : Über den "Embden-Meyerhof-Abbau-Weg" wird Glucose-6-Phosphat (G-6-P) in zwei Triosen gespalten, die schließlich in Pyruvat umgewandelt werden, das unter aeroben Verhältnissen in den Citratcyclus eintritt, unter anaeroben Bedingungen aber in Lactat übergeht. Als zweiter Abbauweg ist der "Pentose-Phosphat-Cyclus" bekannt : hierbei wird G-6-P über eine Reihe von Zwischenstufen zu Ribose-5-P umgewandelt (25). Als erster Schritt innerhalb des Pentose-Phosphat-Cyclus wird das G-6-P zu Gluconolacton-P oxydiert (dehydriert). Diese Reaktion wird von der G-6-PDH katalysiert :

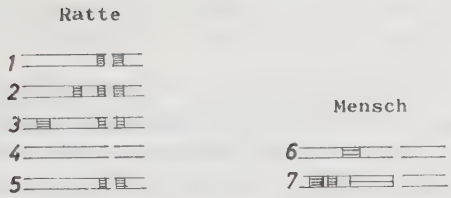


Glucose - 6 - P Gluconolacton - P

Warburg hat diese Reaktion 1931 entdeckt (25). Ihm gelang auch zuerst die Isolierung der G-6-PDH aus Erythrozyten (26).

Das Enzym läßt sich in fast allen tierischen Geweben und Mikroorganismen nachweisen. Im Blutserum kommt es so gut wie nicht vor. Die Aktivität des Enzyms ändert sich im pH Bereich von 7,4 bis 8,6 nur wenig.

Boyer und Porter (27) sowie Tsao (24) haben die Heterogenität der G-6-PDH nachgewiesen. Tsao hat die Isoenzyme der G-6-PDH aus Rattengewebe und aus zwei Zellarten des menschlichen Organismus untersucht. Seine Ergebnisse werden in folgenden Schemata wiedergegeben (nach Tsao) :



1 = Herz; 2 = Leber; 3 = Niere; 4 = Hirn; 5 = Erythrocyt;
6 = Amnionzellen; 7 = Zellen eines Ovar-Carcinom

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Enzym von ihm in maximal drei Fraktionen aufgetrennt werden konnte.

- - - - - - - - - - - - - -

Wie die Abb. 5 zeigt, sind wir zu folgenden Ergebnissen gekommen :

Bei der Rinder-R e t i n a (R) ist nur eine Fraktion mit G-6-PDH Aktivität festzustellen, welche anodenwärts wandert und sich als breite, dunkelblau angefärbte Bande bis zum Startschlitz zurückverfolgen läßt. Die Gegend um den Startschlitz ist besonders stark angefärbt, ohne daß wir daraus ohne weiteres auf eine zweite Fraktion schließen wollen. Auf das Phaenomen der intensiven Anfärbung in nächster Umgebung des Retina-Startschlitzes, welches wir auch bei der alkalischen Phosphatase besonders ausgeprägt fanden, kommen wir in der abschließenden Diskussion noch einmal zurück. Eine kathodenwärts wandernde Fraktion ließ sich nicht nachweisen.

Abb. 5

Im Rinder-S e r u m (S) läßt sich ebenfalls eine anodenwärts wandernde Fraktion als langgestreckte Bande anfärben. Das Enzym aus dem Serum ist deutlich weiter gewandert als das aus der Retina.

Wir kommen hier noch auf ein Merkmal der Serumfraktion zu sprechen, dessen theoretische Erörterung der Diskussion vorbehalten bleiben soll.

Die elektrophoretische Auftrennung der Serumfraktion ergibt folgendes eigentümliche Bild : Das Enzym ist zu einer langen Bande auseinander gezogen, die sich vom Startpunkt aus bis weit zur Anode hin erstreckt. Die anodische Front ist dabei an beiden Seiten nach vorne gezogen (vgl. Abb. 5).

Die nach vorn gezogenen Seitenränder der Bande begrenzen zwischen sich eine aufgehellte Zone. Anschließend an die Aufhellungszone findet die Bande, in welche die Seitenränder wieder kontinuierlich eingehen, anodenwärts ihre Fortsetzung.

Aufgrund dieser Beobachtung neigen wir zu der Ansicht, daß es sich hier nicht um zwei getrennte Fraktionen handelt, sondern vielmehr um eine A u s s p a r u n g innerhalb ein und derselben lang auseinandergezogenen Fraktion.

An Hand von Vergleichen mit der elektrophoretischen Protein-Auftrennung des Rinderserums konnten wir feststellen, daß die Aussparung bezüglich der Wanderungsgeschwindigkeit an derselben Stelle zu finden ist wie die α_2-Globulin-Fraktion aus der Protein-Elektrophorese.

Kathodenwärts war keine Enzymaktivität festzustellen.

Wir fassen zusammen :
In der Rinder-Retina und im Rinder-Serum lassen sich je eine Fraktion der G-6-PDH nachweisen. Sie wandern zur Anode. Die Serumfraktion ist durch eine deutliche Aussparung gekennzeichnet.

Kathodenwärts war in Retina und Serum keine Enzymaktivität festzustellen.
In 8 Tage alter Retina ist G-6-PDH-Aktivität kaum noch nachzuweisen.

Experimentelles

Elektrophoresebedingungen

Temperatur während der Elektrophorese : 6° C
Puffer : Veronal-Stammpuffer 1 : 4 verdünnt
Inkubationszeit : 10 - 60 Stunden
Elektrophoreselaufzeit : 45 Min. bei 27 V/cm

Inkubationsansatz für G-6-PDH

4,8 ml Aq.dest.
3 ml TRA - HCl (pH 8,3; 0,1 m)
0,9 ml $BaCl_2$ (0,67 m)
4,5 mg NBT
3,0 mg TPN
9,0 mg G-6-P
$BaCl_2$ wird nicht unterschichtet, sondern in die Inkubationslösung gegeben.

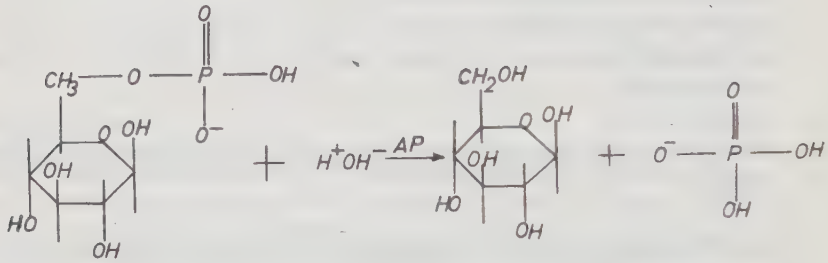
Der Überstand des Retina-Homogenisates und das Serum werden unverdünnt verwendet.

Einzelheiten des allgemeinen Arbeitsvorganges sind im Abschnitt über die LDH nachzulesen.

5. Abschnitt · Alkalische Phosphatase (AP)

Die AP gehört zu der Gruppe der Phospho-Monoesterasen, einer Untergruppe der Hydrolasen. Das pH-Optimum liegt bei 7-8. Sie spaltet nur Monoester der Phosphorsäure. Als physiologisches Substrat dienen vermutlich die Zuckerphosphate, nicht die Nucleotide (28).

Die Funktion dieses Enzyms, nämlich die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäure-Monoestern, kann am Beispiel des Glucose-6-Phosphat wie folgt formuliert werden :

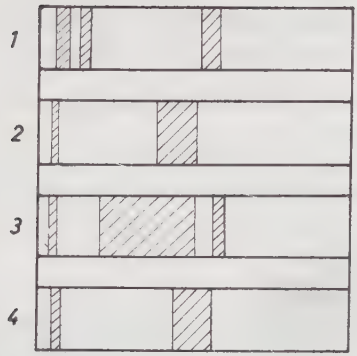


Glucose - 6 - P Glucose Phosphat

Das Enzym kommt beim Menschen in der Leber, der Niere, im Dünndarm und im Knochen vor; im Knochen ist es an der Bildung der anorganischen Knochensubstanz beteiligt. Pathologisch erhöhte Serumwerte beruhen u.a. auf einer vermehrten Osteoblastentätigkeit. Im Wachstumsalter sind die Normalwerte deutlich höher als bei Erwachsenen (29).

Das Enzym wurde schon mit verschiedenen Methoden eingehend studiert (30, 31, 32). Insbesondere Moss und King (33) aber auch Boyer (34) haben mittels der Stärkegel-Elektrophorese die AP auf ihre Isoenzyme hin untersucht.

Moss und King fanden maximal drei Isoenzyme, welche sich in den untersuchten, menschlichen Organen (Leber, Dünndarm, Niere, Knochen) wie folgt verteilen (nach Moss und King) :



1 = Leber
2 = Dünndarm
3 = Niere
4 = Knochen

Daraus ist zu entnehmen, daß alle gefundenen Isoenzyme unter den von Moss und King angewandten Bedingungen zur Anode gewandert sind, und daß in Leber und Niere die meisten Isoenzyme, nämlich drei, gefunden wurden.

Das Isoenzym-Muster der AP, wie wir es in der Retina und im Serum von Rind gefunden haben, stellt sich folgendermaßen dar (Abb. 6):

Die AP der R e t i n a (R) läßt sich in drei Isoenzyme auftrennen, wobei zwei zur Kathode wandern, eins zur Anode. Die Gegend um den Startschlitz ist intensiv angefärbt. Das schnellere, kathodische Isoenzym hat etwa die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie das anodische.

Abb. 6

Die Bande des anodisch wandernden Isoenzyms läßt sich bis zum Startschlitz zurückverfolgen; die zur Kathode hin lokalisierten Isoenzyme sind vom Startschlitz und untereinander deutlich getrennt.

Im Serum (S) läßt sich die AP in zwei anodisch wandernde Isoenzyme auftrennen, wobei das schnellere von ihnen weiter gewandet ist als das zur Anode hin gefundene der Retina. Beide Isoenzyme des Serums sind sehr deutlich von einander getrennt.

Wir fassen zusammen :
In der Rinderretina lassen sich drei Isoenzyme mit AP-Aktivität nachweisen : eins anodenwärts, zwei kathodenwärts wandernd.

Im Rinderserum haben wir zwei Isoenzyme der AP gefunden. Beide wandern zur Anode.

Experimentelles

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Dehydrogenasen (LDH, MDH, ICDH, G-6-PDH) hat es sich bei der AP als vorteilhaft erwiesen, die Konzentration des Agar-Gel auf den Objektträgern zu ändern und einen anderen Puffer für die Bereitung des Agargel zu wählen.

Folgende beide Pufferlösungen haben sich bewährt :

1. Veronal-Acetat-Puffer, pH 8,2; $\mu = 0,1$
   (nach Michaelis (15))
2. Veronal-HCl-Puffer, pH 8,4; $\mu = 0,1$
   (nach Hausamen (35))

ad1 : Herstellung des Puffers
294,3 g Na-diaethylbarbituricum)
194,3 g Na-Acetat-Trihydrat) gelöst in 10 000 ml Aq.dest.
8 Teile der Stammlösung werden mit 9,6 Teilen Aq.dest. zusammengegeben; der pH = 8,2 wird mit 0,1 m HCl eingestellt. Dann ist $\mu = 0,15$.
Auf 2 Teile Puffer kommt 1 Teil Aq.est., dann ist $\mu = 0,1$.

ad2 : Herstellung des Puffers
17 g Na diaethylbarbituricum) ad 1 000 Aq.dest. lösen
23,5 g n HCl) (pH = 8,4; $\mu = 0,1$)

Herstellung des Agar-Gel (2 %)
2 g Reinagar 15 Min. in Wasserbad erhitzen
50 ml Puffer $\mu = 0,1$
50 ml Aq.dest.

Dieses Gel wird nur für die Objektträger verwendet.
Das Gel enthält also Puffer mit $\mu = 0,05$

Das Gel zum Ausgießen der Elektrophoresekammer ist in Bezug auf den Agar 1 %-ig und enthält Puffer mit $\mu = 0,1$. Auch der flüssige Puffer in den Elektrodenkammern (vgl. Abb. 2) hat die Ionenstärke von $\mu = 0,1$.

	Agar auf den Objektträgern	Elektrolytblöcke i.d.E'phse-Kammer	Puffer in den Elektrodenkammern
Agar-Konz. (%)	2	1	
Ionenstärke (μ)	0,05	0,1	0,1

4. Elektrophoresebedingungen

Laufzeit der Elektrophorese : 20 - 30 Min. bei 27 V/cm
Temperatur der Elektrophorese : 6° C
Inkubationszeit : ca. 24 Stunden

Die Anfangstemperatur von 6° C steigt bei einer Laufzeit von 30 Min. bis auf 17° C an. Die Ursache hierfür wird in der doppelten Konzentration des Agar gesehen (größere Reibung der Ionen am Gel).

5. Inkubationsansatz für AP

a) 35 mg α-Naphthylphosphat, gelöst in 5 ml Na diaethylbarbituricum
b) 105 mg Variamin-Blausalz-B conz. gelöst in 100 ml Na diaethylbarbituricum (2 %)

a) und b) zusammengeben und pH auf 9,4 einstellen.

Einzelheiten des Arbeitsvorganges mögen im Abschnitt der LDH nachgelesen werden.

III. Diskussion

1. Ein Nachteil des von uns eingeschlagenen Verfahrens ist, daß es sich hier um ein Homogenisat der gesamten Retina handelt. Es stellt praktisch ein Conglomerat aller Retina-Schichten und-Zellen dar, so daß wir keine Aussage darüber machen können, welcher Retinaschicht oder welchem Zelltyp das jeweils gefundene Isoenzym zuzuordnen ist.

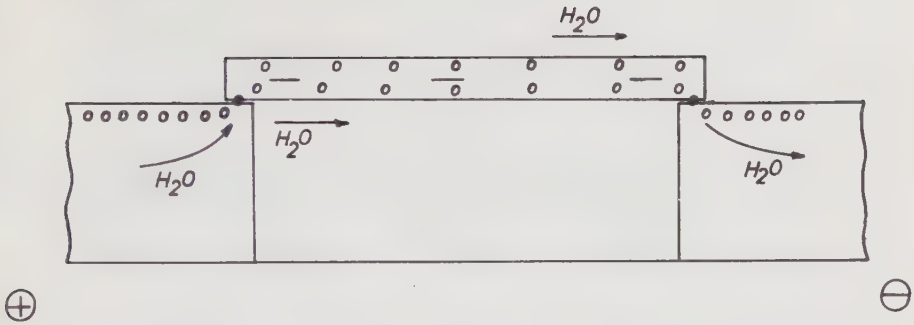
   In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Methode von Honegger (5) hingewiesen, der dieses Problem dadurch löst, daß er Stanzlinge aus der Retina entnimmt und unter histologischer Kontrolle mit dem Mikrotom in einzelne Schichten hobelt. Diese Mikroscheibchen werden dann in die Startschlitze einer Agargel-Elektrophorese eingesetzt. Die LDH-Isoenzyme werden in üblicher Weise mit der Tetrazolium-Salz-Methode nachgewiesen.

   Die technischen Mittel für die Durchführung dieser Methode waren uns nicht zugänglich.

2. Es scheint uns angebracht, an dieser Stelle kurz auf die Störungen während der Elektrophores durch die sog. "Elektro-Osmose" einzugehen. Sie werden in der Apparatur nach Wieme durch die Verwendung übergroßer Agar-Blöcke an den Elektrotroden vermieden.

   Es handelt sich dabei um folgendes:
   Würde man die in der Agar-Gel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine unter gleichen Spannungs- und pH-Bedingungen in der freien Elektrophorese auftrennen, so würden sie alle anodenwärts wandern.

   Sie werden durch folgenden Umstand daran gehindert: Das Agar-Gel weist eine gewisse Anzahl negativ geladener, anionischer Gruppen auf, welche bestrebt sind, das Agar-Gel im elektrischen Feld in Richtung Anode zu bewegen. Da diese Bewegung aus mechanischen Gründen wegen der Steifigkeit des Agar-Gel nicht stattfinden kann, erfolgt sie in umgekehrter Richtung als Bewegung des Lösungswassers zur Kathode hin. Sie überlagert sich der Wanderung der Proteine im elektrischen Feld. Würde man nun als Elektrolyt-Brücken puffergetränkte Filtrierpapier-Streifen verwenden (das Papier enthält keine



Schema zur Elektro - Osmose

anionischen Gruppen), so bliebe in diesem die elektroosmostische Störung aus. Aufgrund der unterschiedlichen Flüssigkeitsströmungsrate träte daher eine Flüssigkeitsverarmung an der Anodenseite des Agar-Gel ein. Sie wird in der Anordnung nach W i e m e (vgl. Schema) dadurch vermieden, daß als Elektrolyt-Brücken große Agar-Blöcke verwendet werden. Dadurch wird erreicht, daß sich die Quellungs- bzw. Entquellungserscheinungen vom Objektträger weg in die Nähe der Elektroden verlagern. Darin mag ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens gesehen werden (vgl. auch im Abschnitt über die LDH die Arbeitsweise nach der obengenannten Apparatur).

Weitere elektrochemische Einzelheiten mögen an anderer Stelle (36) nachgelesen werden.

3. Interpretationsversuche

a) Über die Aussparung bei der G-6-PDH-Anfärbung aus der Serumelektrophorese

An anderer Stelle (vgl. Abschnitt über die G-6-PDH) haben wir schon die Aufhellungszone beschrieben, die wir bei der G-6-PDH-Anfärbung aus der Serum-Elektrophorese in mehr oder weniger deutlicher Ausprägung regelmäßig gefunden haben. Wir möchten

vermuten, daß diese eigenartige Erscheinung auf dem Vorliegen eines Inhibitors im Serum beruht. Der von uns vermutete Inhibitor ist offenbar eine makromolekulare Substanz, wahrscheinlich ein Protein. Andernfalls wäre es sicher unter den gewählten Elektrophoresebedingungen über die Grenzen des Objektträgers abgewandert.

Wir neigen zu der Ansicht, daß es sich hierbei um einen competiven Hemmer handelt. Ein nicht-competitiver Inhibitor hätte nämlich mit dem Enzymprotein covalent reagiert und die elektrophoretische Trennung der beiden wäre dann erst gar nicht möglich gewesen.

b) Über die Deformation des Retina-Startschlitzes in Zusammenhang mit der Proteinanhäufung auf seiner Anodenseite

Es wurde wiederholt und reproduzierbar beobachtet, daß sich das Agargel nach der Elektrophorese anodenwärts dicht vor dem Startschlitz des Retina-Homogenisates faltig aufgeworfen hatte. Der Startschlitz war nach dieser Richtung hin bogenförmig erweitert. Wir bringen diese Beobachtung mit einer weiteren in Verbindung : nämlich, daß der Großteil der löslichen Proteine des Retina-Homogenisates bei der Elektrophorese anodenwärts dicht vor dem Startschlitz, also an der gleichen Stelle, zu finden ist. Hier liegt offenbar ein Molekülsiebeffekt vor : Großmolekulare Proteinmoleküle aus der Retina haben sich im Maschenwerk des Agargels verfangen und werden mechanisch an ihrer Fortbewegung im elektrischen Feld gehemmt. Das relativ unkonzentrierte Agargel hat mechanisch nicht die entsprechende Widerstandsfähigkeit : Es weicht demzufolge aus und wird verformt. Die Annahme, daß dieser Befund auf relativ hochmolekulare Struktur-Proteine der Retina zurückzuführen ist, wird durch die Beobachtung bestärkt, daß das Maximum der Enzymaktivitäten bei der Isoenzym-Auftrennung an derselben Stelle gefunden wird. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich dabei um Enzymaktivitäten handelt, die an diese Struktur-Proteine gebunden sind.

c) Über die intracelluläre Lokalisation von (Iso-) Enzymen und ihre postexperimentelle Identifizierung

Wie wir heute wissen, sind der Citratcyclus und die Atmungskette in den Mitochondrien lokalisiert, während der Embden-Meyer-Hof-Abbau-Weg im Cytoplasma der Zelle abläuft (37). Demzufolge können wir aus dem Nachweis eines nur im Citratcyclus vorkommenden Enzyms, z.B. der ICDH, schließen, daß bei der Homogenisierung die Mitochondrien zertrümmer wurden.

Handelt es sich aber (wie bei der MDH) um ein Enzym, welches in den Mitochondrien und in dem Cytoplasma, also in zwei verschiedenen Strukturen vorkommt, so bleibt die Frage offen, welcher Zellstruktur die gefundenen Isoenzyme zuzuordnen sind. Ein Homogenisat, in welchem mitochondriale und cytoplasmatische Anteile nicht voneinander getrennt sind, läßt aber eine solche Identifizierung nicht zu.

d) Über die Ausdifferenzierung und Regulationsmechanismen der Isoenzyme am Beispiel der LDH

Den nachfolgenden Erörterungen liegt eine Abhandlung von Wachsmuth (38) zugrunde, aus welcher auszugsweise wörtlich zitiert wird. Seit wir von der Heterogenität mancher Enzyme, ihrer intrazellulären Lokalisation und ihrem von Organ zu Organ verschiedenen "Phaenotypus" (ihrer Isoenzymverteilung) Kenntnis haben, stellt sich naturgemäß die Frage nach den Mechanismen, die der organspezifischen Ausbildung der Isoenzym-Muster im Rahmen der Ontogenese zugrunde liegen.
Untersuchungen an der LDH brachten folgende Ergebnisse :
Alle LDH-Isoenzyme (M.G. = 140 000) lassen sich in vier Monomeren oder Untereinheiten (M.G. = je 35 000) aufspalten. Alle vier Monomeren lassen sich auf zwei Typen (A und B), die chemisch different sind, zurückführen. Für die Isoenzyme der LDH ergeben sich demgemäß folgende Kombinationen :

Isoenzyme :	I	II	III	IV	V
Untereinheiten :	AAAA	BAAA	BBAA	BBBA	BBBB

Die Isoenzyme, die sich aus den Monomeren in verschiedenen Kombinationen zusammensetzen, sind chemisch eigene Individuen. Da die DNS, die sich im Kern, d.h. in den Chromosomen befindet, die gesamten Proteinsynthesen steuert, sind für die Bildung der LDH gemäß der Typen A und B mindestens zwei Gen-Orte in den Chromosomen anzunehmen. "... Analysiert man die Isoenzyme nach der Summe der Anteile an B und A, so ergeben sich nachfolgende Überlegungen : Solange A und B gleichmäßig gebildet werden, muß die Verteilung auf die einzelnen Isoenzyme symmetrisch binomial sein +). Dies ist der Fall für die meisten Gewebe vom frühembryonalen Stadium bis zum erwachsenen, für alle aber im frühembryonalen. Erst in der postmitotischen Phase tritt eine Differenzierung ein : Im Gewebehomogenat steigt die enzymatische Aktivität pro Zelle an, d.h. es wird für die unter anaeroben Bedingungen arbeitenden Gewebe zusätzlich mehr A gebildet, für die unter aeroben mehr B. Da alle Amitosen mit Verdopplungen der Chromosomensätze einhergehen, haben wir polyploide Zellen vorliegen. Durch Polyploidisierung könnte es somit zu einer Vermehrung des einen spezifischen Gen-Ortes für B bzw. A und dadurch zu der effektiv anderen Verteilung der Anteile an den einzelnen Isoenzymen kommen .... Die Regulation der Synthese der Isoenzyme der LDH ist offensichtlich von mindestens zwei Chromosomensätzen abhängig ++). Die gleichförmige, gegenseitige Beeinflussung wird durch eine Vermehrung der Chromosomensätze aus dem Gleichgewicht gebracht : Es wird zusätzlich mehr von dem Typus A oder B gebildet .... Die Amitose tritt nur bei hochdifferenzierten, spezialisierten Zellen zur Ausbildung einer Leistungsqualität auf. Sie ist am Beispiel der LDH-Isoenzyme der morphologische Ausdruck für die Differenzierung der Isoenzyme in der Anpassung auf ihre Stelle im Stoffwechsel .... Es liegt also ein Regulationsmechanismus vor, der durch verschiedene Grade der Ploidisierungsstufen eine spezifische Eiweißsynthese zur optimalen Ausnutzung der Bedürfnisse im Stoffwechsel einzelner Gewebe bzw. Zellverbände steuert .... In vivo vorwiegend aerob arbeitende Gewebe bilden mehr Untereinheiten B, anaerob arbeitende mehr Untereinheiten A ...."

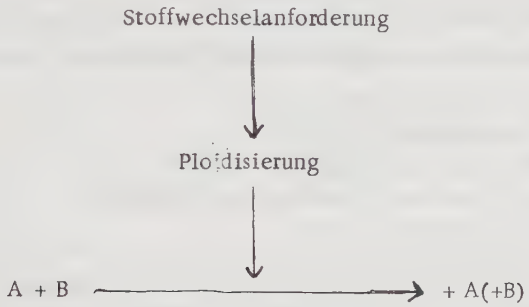
Wachsmuth (l. c.) unterstellte also, daß in der amitotischen Phase einzelne Chromosomen bzw. Chromosomenanteile bevorzugt vervielfacht werden, und daß damit gehäuft Gen-Orte für die Proteinsynthese e i n e r der beiden Untereinheiten A bzw. B geschaffen werden.

+) Eigene Anmerkung : d.h. Typ III der LDH ist am meisten vertreten.

++) Eigene Anmerkung : Diese These bezieht sich nur auf die Isoenzyme I - V.

Entsprechend verschiebt sich das Isoenzymverhältnis : Überwiegt die Synthese des Typ A (unter anaeroben Bedingungen), findet man in erster Linie Isoenzym I. Wird dagegen (bei aeroben Stoffwechsel) bevorzugt die Untereinheit B gebildet, liegt der Schwerpunkt der Isoenzymverteilung bei Isoenzym V.

Wachsmuth gibt dazu folgendes Schema :



Inwieweit diese Vorstellungen sich möglicherweise einmal verallgemeinern lassen als Grundprinzip der Biosynthese aller Enzyme im Sinne einer autogenen Steuerung der entsprechenden, optimalen Zusammensetzung der Isoenzym-Muster gemäß der Stoffwechselbedürfnisse durch die DNS, müssen zukünftige Forschungen zeigen.

IV. Zusammenfassung

Die Aufschlüsselung der Isoenzym-Muster in menschlichen oder ersatzweise tierischen Geweben gewinnt immer mehr an Bedeutung, seitdem begonnen wurde, die Serum-Fermente bezüglich ihres "Phaenotypus", d.h. des Verteilungsmusters ihrer Isoenzyme, für die klinische Diagnostik auszuwerten.

In der vorliegenden Abhandlung wurden die Isoenzym-Muster von fünf Fermenten, darunter vier Dehydrogenasen, aus Retina-Homogenisat des Rindes im Vergleich zum Serum vom Rind besprochen :

1. Lactat-Dehydrogenase (LDH)
2. Malat-Dehydrogenase (MDH)
3. Isocitronensäure-Dehydrogenase (ICDH)
4. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH)
5. Alkalische Phosphatase (AP)

Die elektrophoretische Auftrennung der Fermente erfolgte durch die Agargel-Elektrophorese. Die im Gel gefundenen Banden wurden bei den Dehydrogenasen durch die Tetrazoliumsalz-Färbung, bei der alkalischen Phosphatase durch die Variamin-Blausalz-Färbung direkt sichtbar gemacht.

1. Die LDH aus Retina und Serum läßt sich in drei Isoenzyme auftrennen, zwei anodenwärts, eins kathodenwärts wandernd. Die Isoenzyme des Serums sind schwächer angefärbt als die gefundenen der Retina.

2. Die MDH der Retina konnte in drei Fraktionen aufgetrennt werden : zwei anodenwärts, eine kathodenwärts wandernd. Im Serum wurden zwei anodisch wandernde Fraktionen gefunden.

3. Bei der ICDH fanden wir in der Retina zwei anodische Fraktionen, wobei die langsamer wandernde praktisch am Startschlitz verblieb. Im Serum ließ sich keine ICDH-Aktivität nachweisen.

4. Die G-6-PDH ließ sich in Retina und Serum als je eine Bande darstellen. Die Bande des Serums ist durch eine Aussparung gekennzeichnet, welche bezüglich der Wanderungsgeschwindigkeit mit der α_2-Globulin-Fraktion aus der Proteinelektrophorese des Rinder-Serums identisch zu sein scheint. Wir vermuten in dieser Aussparung einen competitiven Inhibitor, wobei es sich wahrscheinlich um ein makromolekulares Protein handelt.

5. In der Retina ließen sich drei Isoenzyme mit AP-Aktivität nachweisen : eins anodenwärts, zwei kathodenwärts wandernd. Im Serum fanden wir zwei anodisch wandernde Isoenzyme der AP.

Literaturverzeichnis

1 Amelung, Die Heterogenität von Fermenten S. 125/126

2 Amelung, Die Heterogenität von Fermenten S. 121

3 Amelung, Die Heterogenität von Fermenten S. 123

4 Wieland/Pfleiderer, Angew. Chemie, 74. Jhg. 1962, Nr. 8, 267/269

5 Honegger, C. G.; Vortag aus dem Symposion der Federation of European Biochemestry" Histologochemical Investigations of the LDH-Isoenzymes in the retina" Wien (1965)

6 Fowlks, W. L., Gingrich, R. E., Eldrige; Investig. Ophtal.; 3, 171-81 (1964)

7 Dubach; Schw. Med. Wschr.; 92, 1436 - 42 (1962)

8 Wieme, R. J.; Studies on agar-gel electrophoresis, Arscia, Brussel (1959)

9 van der Helm, H. G.; Zondag, H. A., Hartog, H. A. PH. van der Kooi, M. W.; Clin. Chim. Acta; 7, 540-44 (1962)

10 Rauen, H. M.; Bioch. Taschenbauch; S. 456-57 (1965)

11 Baum, J. L., Arch. of Ophtal; 70, 103-105, (1963)

12 Tsao, K. C. et al.; J. Amer. Chem. Soc.; 78, 6139 (1956)

13 Nachlas, M. M. et al.; J. Biol. Chem.; 235, 2739 (1960)

14 Pearce, A. G. E.; Acad. Press, Inc. p 54 (1961)

15 Schwick, G., Störiko, K.; Blätter f. med. Diagnostik Mai 1964, S. 11 ff.

16 Biel, H. et al.; "Einige neuere analytischen Methoden zur Charakterisierung der Plasmaproteine"; Behring-Werke AG, Marburg-Lahn.

17 Grabar, P.; Burtin, P.; Immunoelektrophoret. Anal.; S. 37 (1964)

18 Bücher, Th., Klingenberg, M.; Angew Chem.; 70, 552 (1958)

19 Delbrück, A., Zebe, E., Bücher, Th., Bioch. Z.; 331, 273 (1959)

20 Bergmeyer, H. U. ; Methoden d. enzym. Anal. ; S. 757 (1962)

21 Vesell, E. S., Bearn, A. G., Elliot; J. Clin. Invest. ; 37, 672 ff. (1958)

22 Elliot, Vesell, S., Bearn, A. G., Ann. N. Y. Acad, Sci. ; 75, 286-91 (1958)

23 Karlson, P. ; Lehrbuch d. Biochemie; S. 167 (1961)

24 Tsao, M. U. ; Arch. Bioch. ; 90, 234-38 (1960)

25 Karlson, P. ; Lehrbuch d. Biochem. ; S. 222 (1961)

26 Bergmeyer, H. U. ; Methoden d. enzyn. Anal. ; S. 744 (1962)

27 Boyer, S. H. Porter, I. H. ; J. Clin, Invest. ; 41, 1347 (1962)

28 Karlson, P. ; Lehrbuch d. Biochem. ; S. 110 ff. (1961)

29 Bergmeyer, H. U. ; Methoden d. enzym. Anal. ; S. 779 (1962)

30 Schlamowitz, M. ; Ann. N. Y. Acad. Sci. ; 75, 373 (1958)

31 Moss, D. W. et al. ; Biochem. J. ; 81, 441 (1961)

32 Kowlessar, O. D. et al. ; Proc. Soc. exp. Biol. Med. ; 100, 191 (1959)

33 Moss, D. W., King, E. J., Biochem. J. ; 84, 192 (1962)

34 Boyer, S. H. ; Science 134, 1002 (1961)

35 Hausamen; Med. Klin. d. Uni. Ffm. ; pers. Inf. unveröffentl.

36 Biel, H. et al. ; Behringwerk-Mitteilungen; 43, 1-33 (1964)

37 Karlson, P. ; Lehrbuch d. Biochem. ; S. 273 (1961)

38 Wachsmuth, E. D. ; Klin. Wochenzeitschr. ; 43, 69 - 72 (1965)

Herrn Professor Dr. W. A. Lieb möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Dr. D. Post danke ich aufrichtig für die Einführung in die Laboratoriumstechnik, die wertvollen Anregungen und das stets freundliche Interesse bei der Durchführung dieser Arbeit.

Curriculum vitae

Am 15. Juni 1940 wurde ich als Sohn des Dr. med. Hermann Schmutte und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Weber, in Frankfurt am Main geboren.

Hier besuchte ich die Volksschule, anschließen ein Realgymnasium, an dem ich am 13. Februar 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Frühjahr 1960 begann ich das medizinische Studium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main. Nach dem zweiten Studiensemester bestand ich das Vorphysikum. Das dritte Studiensemester absolvierte ich an der Universität zu Freiburg im Breisgau. Nach dem fünften Studiensemester bestand ich das Physikum.

Das klinische Studium absolvierte ich in Frankfurt am Main und bestand am 23. August 1966 das medizinische Staatsexamen.

Frankfurt am Main, 1966

Edgar Schmutte

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Professor Altmann
Professor Artelt
Professor Betke
Professor Brehm
Priv.Doz. Contzen
Professor Czerny
Professor Deckwitz
Professor Duus
Professor Fischer
Professor Fleckenstein
Professor Frey
Professor Frick
Professor Geißendörfer
Professor Gerchow
Professor Giersberg

Professor Greven
Professor Grüner
Professor Güntz
Professor Halbsguth
Professor Heinz
Professor Heller
Professor Hermann
Professor Herzberg
Professor Hövels
Professor Hoff
Professor Holtz
Professor Holzer
Professor Jürgens
Professor Käser
Professor Kahlau
Professor Keller
Professor Kramp
Professor Kulenkampff

Priv.Doz. Kummer
Professor Lapp
Professor Lieb
Professor Lissner
Professor Mittermaier
Professor Müser
Professor Ortmann
Professor Otto
Priv.Doz. Palm
Professor Pirlet
Priv.Doz. Puff
Professor Radenbach
Professor Rajewski
Professor v. Reckow
Professor Ried
Professor Rossberg
Professor Rotter
Professor Royen
Priv.Doz. Schmith
Priv.Doz. Schmitt-Neuroth
Professor Schneider
Professor Schwenzer
Priv.Dez. Seubert
Professor Starck
Professor Steigleder
Professor Strnad
Professor Thiel
Professor Ungeheuer
Professor Weiße
Professor Wezler
Professor Wieland
Professor Zahn
Professor Zimmermann
Professor Zutt

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel :
"Die Isoenzym-Muster einiger Fermente aus Rinder-Retina und Rinder-Serum"
in der Universitätsaugenklinik Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W.A. Lieb ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Edgar Schmutte